

빈랑으로부터 Elastase 저해물질의 분리 및 특성조사

조중재, 이권국*, 조병기*, 최정도
충북대학교 생명과학부, *코리아나화장품 연구소

Isolation and Characterization of Elastase Inhibitor from *Areca catechu*

Joung-Jae Cho, Kun-Kook Lee*, Byung-Kee Jo*, and Jung-Do Choi
Department of Biochemistry, Chungbuk National University
* Coreana Cosmetics R&D Center

요 약

Elastase (EC 3. 4. 4. 7)는 구조 단백질인 fibronectin, collagen 그리고 elastin을 포함한 다양한 단백질을 분해한다. Elastase는 생체 염증 방어의 중요한 성분이며, α_1 -proteinase inhibitor (α_1 PI)와 같은 생체 내부에 있는 단백질 분해 효소 저해제들에 의해 조절된다. 그러나, 만성 염증의 결과, elastase와 α_1 PI 사이의 균형이 elastase 쪽으로 기울어지면 조직 파괴가 일어나게 된다. 본 연구자들은 이미 피부의 진피내에서 백혈구로부터 과다하게 분비되는 elastase를 저해하는 물질을 찾기 위하여, 150 여가지의 한방 식물 추출물에 대해 elastase 저해활성을 스크리닝 (screening) 하여, 빈랑 (*Areca catechu*) 추출물이 가장 높은 저해활성을 보여줌을 확인하였다.

본 연구에서는 유효성분을 찾기 위하여 빈랑을 90% 에탄올로 추출한 다음, 다양한 용매를 사용하여 분획하였고, 각 분획에 대해 elastase 저해활성을 측정하였다. 이 중 저해 활성이 뛰어난 분획은 silica gel 컬럼 크로마토그래피, preparative TLC 그리고 역상 HPLC를 실시하였다. 역상 HPLC에서 elastase 저해 활성이 있는 peak은 성분을 확인할 수 있는 여러 가지 정색 반응과 UV, IR 스펙트럼을 통하여 phenol 성 물질임을 확

인하였다.

빈랑으로부터 정제한 phenol 성 물질은 돼지 췌장 elastase (Porcine pancreatic elastase ; PPE)와 사람 백혈구 elastase (Human neutrophil elastase ; HNE)에 대한 IC₅₀ 값이 각각 26.9 $\mu\text{g/ml}$ 과 60.8 $\mu\text{g/ml}$ 로서, 기존에 elastase의 저해제로 알려진 oleanolic acid (각각 76.5 $\mu\text{g/ml}$, 219.2 $\mu\text{g/ml}$)와 ursolic acid (각각 31.0 $\mu\text{g/ml}$, 118.6 $\mu\text{g/ml}$)에 비하여 더 우수한 저해 활성을 나타내었으며, PPE와 HNE에 대하여 기질과 경쟁적으로 반응함을 알 수 있었다. 또한 빈랑으로부터 정제한 phenol 성 물질이 염증 과정 중에 발생하는 free radical을 소거할 수 있는지를 조사한 결과, free radical을 50% 소거시키는 농도값이 6 $\mu\text{g/ml}$ 로 표준물질인 비타민 C (19 $\mu\text{g/ml}$)나 butylated hydroxyl toluene (18.5 $\mu\text{g/ml}$)보다 우수한 효과를 나타내었다. 그리고 mast cell내에서 활성화되며 hyaluronic acid를 분해하는 hyaluronidase에 대한 저해를 조사한 결과, IC₅₀ 값이 210 $\mu\text{g/ml}$ 로서 효과적인 저해 활성을 나타내었다.

따라서, 본 연구에서 빈랑으로부터 분리한 phenol 성 물질은 피부 결합 조직을 구성하는 단백질들을 보호함으로써 피부 노화를 억제하는 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

Abstract

We have previously screened 150 medicinal plants on the inhibition of elastase and found a significant inhibitory effects of the extracts of *Areca catechu* L. on the aging and inflammation against the skin tissues.

To isolate and identify the compounds having biological activity, we was further purified by each of the solvent fractions, silica gel column chromatography, preparative TLC and reversed-phase HPLC. Peak in HPLC, which coincided with the inhibitory activity against elastase, was identified as phenolic substance using various colorimetric methods, UV, and IR. IC₅₀ values of phenolic substance purified from *Areca catechu* were 26.9 $\mu\text{g/ml}$ for porcine pancreatic elastase (PPE) and 60.8 $\mu\text{g/ml}$ for human neutrophil elastase (HNE). This phenolic substance showed more potent activity than those of reference compounds, oleanolic acid (76.5 $\mu\text{g/ml}$ for PPE, 219.2 $\mu\text{g/ml}$ for HNE) and ursolic acid (31.0 $\mu\text{g/ml}$ for PPE, 118.6 $\mu\text{g/ml}$ for HNE). According to the Lineweaver-Burk plots, the

inhibition against both PPE and HNE by this phenolic substance was competitive with substrate. Phenolic substance from *Areca catechu* exhibited high free radical scavenging effect ($SC_{50} : 6 \mu\text{g/ml}$) and inhibited effectively hyaluronidase activity ($IC_{50} : 210 \mu\text{g/ml}$). These results suggest that the phenolic substance purified from *Areca catechu* showed anti-aging effect by protecting connective tissue proteins.

I. 서 론

생명체의 노화 과정은 우리 몸의 구성기관 모두에서 일어나고 피부도 마찬가지로 노화해 간다. 피부는 인체의 건강을 조절하는데 매우 중요한 기관이므로 피부 노화 메카니즘과 생체에서 이와 관련된 효소들의 작용기작을 밝히는 연구는 매우 중요하다. 피부 노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체내 뿐만 아니라 피부에서 주로 작용하는 효소 생성의 활성화 또는 노화를 촉진하는 효소를 억제할 수 있는 시스템 구축이 필요하다. PMN elastase 활성의 일부는 complement factors, 림프구 (lymphocyte)의 활성화등과 같이 생체에 유용하게 작용하기도 하지만, 과도한 elastase 활성은 해롭게 작용한다. PMN elastase의 활성은 조직내에서 순환하고 국부적으로 생성되는 elastase 저해제들이 백혈구 주변에 즉각 생김으로써 정상적으로 조절된다. PMN elastase는 다른 단백질 분해효소와 마찬가지로 저해제에 의한 조절 (regulation)을 피할 수 있으며 그 방법으로 다음과 같은 것들이 있다 (1). 1) 효소가 저해제를 압도할 수 있는 충분한 농도로 방출된다. 2) 기질 가까이 효소를 분비함으로써 저해제보다 기질과 더 잘 결합할 수 있게 된다. 3) 국부적으로 $\alpha_1\text{Pi}$ 가 존재하는 곳에 효소를 분비하면 산화에 의해 저해제가 불활성화된다. 이 중 세 번째 메카니즘은 염증이 일어나는 곳에서의 PMN elastase 활성을 잘 설명해 줄 수 있을 것이다. PMN은 자극에 의해 활성화되면 염증이 일어나는 장소에서 다른 과립 효소들과 함께 elastase를 분비하고 동시에 활성 산소종 (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$)을 분비한다. 이러한 활성 산소종 (monocytes와 macrophages에서도 분비됨)과 hypochlorous acid 같은 할로젠 화합물들은 자체로 조직을 손상시킬 수 있을 뿐만 아니라 $\alpha_1\text{Pi}$ 의 활성자리에서 methionine 358을 sulfoxide 유도체로 산화시킴으로써 $\alpha_1\text{Pi}$ 를 불활성화시킬 수 있다. 이렇게 $\alpha_1\text{Pi}$ 가 산화적으로 불활성화되거나 충분한 혈청을 생산하

지 못하는 유전적 결함등에 의해 elastase 활성이 촉진되면, 급성 호흡장애 증후군 (acute respiratory distress syndrome) (2), 관절염 (rheumatoid arthritis) (3), 폐기종 (pulmonary emphysema) (4), 마른버짐 (psoriasis) (5), 수포성 피부염 (bullous dermatoses) (6)등 다양한 질병이 유발되고 이러한 과정은 염증이 일어나는 메카니즘으로 제안되어져 오고 있다.

이에 따라 생체내 elastase를 저해시키는 능력을 보완하기 위한 저해제 개발과 질병 상태에서 proteinase와 antiproteinase간의 불균형을 변화시키려는 연구가 수행되었다. 그 방법의 하나로 α_1 Pi 자체, elafin, 그리고 secretory leukoproteinase 저해제 (7)등과 같은 고분자량의 단백질 성질을 가진 저해제가 사용되어져 왔으며, 이중 몇몇은 재조합 DNA 기술을 응용한 mutant 형태의 저해제들이 만들어져 정맥 주사등의 투여로 처방된 것이 보고되고 있다 (8). 다른 방법으로는 저분자량의 합성 저해제들의 개발이 있다. 합성 저해제들은 단백질 성질의 저해제보다 proteolytic 불활성화에 영향을 적게 받을 수 있고 면역 반응의 위험이 감소되며, 효소 선택성을 조절하는 방법으로써 저해제 구조를 변화시킬 수 있다는 장점이 있다. HNE 합성 저해제들은 peptide-based 저해제들, heterocyclic 저해제들, acylating/alkylating 제 등 크게 세 부류로 보고되고 있다 (9).

본 연구에서는 생체내 주요한 결합 조직의 단백질 분자들을 공격할 수 있는 반응성과 비특이성 (unspecificity) 때문에 커다란 주목을 받고 있으며, 결합 조직에 많은 손상을 주는 것으로 알려져 있는 elastase를 저해시키는 물질을 찾고자 150 여종의 한방식물 추출물을 검색하였고 (10,11), 그 결과 저해 활성이 가장 좋은 빈랑 (*Areca catechu*) 추출물로부터 활성 성분의 분리를 시도하여, 효소와 저해제사이의 반응메카니즘을 규명하고자 한다. 또한 분리된 활성 성분이 elastase를 저해 시킬 뿐만 아니라 피부 노화와 염증을 일으키는데 관련이 깊은 free radical의 소거 작용과 hyaluronidase에 대한 저해 활성을 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료 및 시약

150 여종의 한방 식물은 서울에 있는 경동시장에서 구입하였다. Elastase assay를 위한 사람 백혈구 elastase와 돼지 췌장 elastase는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였고, 각각의 기질인 MeO-Suc-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide와 Suc-Ala-Ala-Pro-ABu-

p-nitroanilide는 Calbiochem에서 구입하였다. 기준 물질로 사용된 Elhibin과 Sophorine은 Pentapharm Ltd (Switzerland, Basel)와 Secma Co. (France, Pontrioux)에서 구입하였다.

Free radical 소거에 필요한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)와 hyaluronidase assay시 사용되는 효소, 기질인 hyaluronic acid 그리고 효소 activator인 compound 48/80은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

빈랑 추출 및 분리에 사용한 용매인 n-hexane, chloroform, ethylacetate, methanol, ethanol, buthanol등은 JIN Chemical & Pharmaceutical Co. Ltd에서 구입하였고, silica gel 60 (70-230 mesh), TLC plate (silica gel 60 F₂₅₄)는 Merck로부터 구입하였다. HPLC용 용매인 메탄올과 물은 Mallinckrodt에서 구입하여 사용하였다. TLC 발색 시약으로 사용한 anisaldehyde는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

2. 사용기기

Spectrophotometric 측정과 UV 스펙트럼은 UV-VIS spectrophotometer (Beckman)를 사용하였고, 시료의 감압 건조와 동결 건조는 각각 evaporator와 lyophilizer를 사용하였다. HPLC는 Hewlett-packard 1050을 사용하였고, HPLC 컬럼은 YMC Co.에서 구입한 ODS-AQ 컬럼 (10×250 mm)을 사용하였다. IR은 Jasco FT/IR-300E spectrophotometer를 사용하였다.

3. Elastase activity assay

돼지 췌장 elastase (PPE ; Sigma) 활성은 기질로서 Suc-Ala-Ala-Pro-ABu-p-nitroanilide를 사용하여 25 °C에서 20분간 p-nitroaniline의 생성량을 410 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다 (12). 반응 용액은 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 µg/ml elastase, 기질로 0.8 mM Suc-Ala-Ala-Pro-ABu-p-nitroanilide (ES IV ; elastase substrate IV ; Calbiochem)와 메탄올에 녹인 각각의 다른 추출물들을 포함한다. 사람 백혈구 elastase (HNE ; Sigma) 활성은 기질로서 MeO-Suc-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide를 사용하여 25 °C에서 20분간 p-nitroaniline의 생성량을 410 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다. 반응 용액은 0.5 M NaCl, 9.8% DMSO, 1% v/v 10 mg/ml BSA (Sigma ; fraction V)를 포함하는 0.1 M HEPES buffer (pH 7.5), 1 µg/ml elastase, 기질로 1.12 mM MeO-Suc-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide (ES I ; elastase substrate I ; Calbiochem)와 메탄올에 녹인 각각의 다른 추출물들을 포함한다.

다. 각 추출물 (crude extract)이 포함된 반응 용액은 25 °C에서 20분간 미리 반응 시킨 후 효소를 첨가함으로써 반응을 시작하였다. Blank는 효소만을 제외한 모든 성분이 포함된 것을 사용하였다. 대조 실험은 저해제가 없는 상태에서의 elastase 활성을 나타낸다. Elastolytic 활성의 1 unit은 분당 1 μmol의 p-nitroaniline을 생성하는 활성으로 정의된다. p-nitroaniline의 ε는 410 nm에서 8800이다 (13). 저해 활성은 다음의 식으로부터 계산한다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A는 저해제가 없는 효소의 활성도를 나타내고 B는 저해제가 있을 때의 효소의 활성도를 나타낸다.

4. 빈랑으로부터 저해 활성 성분의 분리 및 정제

빈랑 1 kg을 증류수로 세척한 다음 오븐에서 바짝 말린 후 분쇄기를 이용하여 분말을 만든다. 이를 90% 에탄올 (EtOH : H₂O = 90 : 10)에 7 일간 상온에서 추출한 다음 이 추출액을 여과한 후 여액을 감압 농축하여 160 g의 조추출물 (crude extract)를 얻었다. 용매 분획물을 얻기 위하여 hexane, chloroform, ethylacetate 및 buthanol를 넣어 분획한 후 각각에 대해 elastase 저해효과를 측정하였다. 각 단계에서는 TLC를 하였으며 전개 용매는 ethylacetate : methanol : Water = 9 : 2 : 2를 사용하였다. 발색은 anisaldehyde 시액을 뿌린 후 TLC plate를 가열하여 발색시켰다. Silica 컬럼 크로마토그래피 용출 분획 중 활성이 높은 분획을 ethylacetate : methanol : Water = 9 : 2 : 2 조건에서 preparative TLC를 하여 활성이 있는 부분을 분취한 다음, 이를 메탄올에 녹여 여과하고 감압 농축하였다.

효소 활성 저해 물질의 정제를 위해 preparative TLC한 시료로 HPLC를 수행하였다. 이 때 컬럼은 YMC-pack ODS-AQ 컬럼 (10 × 250 mm)을 사용하였고, 용매는 methanol : water = 30 : 70 조건으로 용출하였으며 flow rate는 1.5 ml/min, detection은 UV 280 nm에서 측정하였다. 이 때 확인된 각 peak들을 분취하여 elastase에 대한 저해활성을 측정하였다. UV, IR 스펙트럼 및 여러 가지 정성반응 시험으로 성분을 확인 했으며, 프리라디칼 소고 측정(14) 및 hyaluronidase 저해활성도 조사하였다 (15).

III. 결과 및 고찰

1. 빈랑으로부터 elastase 저해 물질의 분리 및 정제

빈랑 (*Areca catechu*)의 종자로부터 elastase를 저해시키는 물질을 분리하기 위한 용매 조건을 찾기 위하여, 각 건조 종자 100 g에 다양한 종류의 용매 1 L씩을 첨가하여 얻은 추출물로 elastase 저해 활성을 측정하였고 그 수득률을 계산하였다 (Data not shown). 용매로는 100% 메탄올, 75% 메탄올, 50% 메탄올, 100% 에탄올, 75% 에탄올, 50% 에탄올, 80% 아세톤, 그리고 증류수를 사용했다. 수득률은 100% 에탄올에서 15.54 g으로 가장 많은 양을 얻었고, elastase 저해 활성도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 64%로 가장 높게 나타났다. 이 결과를 토대로 빈랑을 추출할 용매 조건을 90% 에탄올로 결정하였다. 빈랑의 90% 에탄올 추출물 (crude extract)은 비극성 용매부터 점차 극성을 증가시킨 용매를 사용하여 분획하였고, 각 분획별 추출물로 돼지 췌장 elastase에 대하여 다양한 농도에서 저해 효과를 측정하였다. 각 분획별 추출물의 수득률과 elastase에 대한 IC_{50} 값은 Table 1에 나타났다. Hexane, chloroform, ethylacetate 분획은 수득률과 저해 활성이 모두 낮은 반면, buthanol과 물 분획에서는 수득률이 각각 21.90%와 30.29%로 높게 나타났고, elastase에 대한 저해 활성은 IC_{50} 값이 각각 104.93 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 31.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 이 결과로부터 elastase를 저해시키는 유효 성분은 hexane이나 chloroform층에는 거의 없고 ethylacetate층에 약간, 그리고 buthanol층과 물층에 많이 존재하는 것을 확인할 수 있었고, 상당히 극성이 높은 성분임을 알 수 있었다. 이 결과에서 90% 에탄올 추출물보다 분획한 추출물들의 저해 활성이 더 낮아지는 이유는 활성을 가진 여러 종류의 화합물들이 모여서 공동 상승 작용을 보여주다가, 분획되면서 활성을 가진 화합물들이 분산되어 나타나는 현상으로 추측된다. 다음 정제 단계로 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 이 때, 수득률과 효소 저해 활성이 더 좋은 물층은 극성이 너무 커서 실험시 다루기 어려울 것으로 판단한 후, 비슷한 활성을 가진 buthanol 분획 추출물을 선택하여 loading하였다. 용출 용매조건으로는 ethylacetate : methanol : water의 비율을 단계적으로 극성을 증가시켜 사용하였다. 각각의 분획은 감압 건조시킨 후 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 elastase 저해 효과를 알아보았다. 이 단계에서도 상대적으로 극성이 큰 용매조건에서 효소 저해 활성이 나타났으며 활성이 좋은 분획을 모아 preparative TLC를 수행하였다. 용매 조건은 ethylacetate : methanol : water = 9 : 2

: 2를 사용하였고, Rf 값이 0.13인 부분을 분취하여 얻은 시료로 HPLC를 수행하였다 (Fig. 2). HPLC 수행 결과, peak들은 5, 7, 9 분대에서 나타났고, 각각의 peak들을 따로 분취한 다음 elastase에 대한 저해 활성을 측정하였다. 이 중에서 9 분대에 나타난 세번째 peak에서 효소 저해활성이 있음을 확인하였다. Fig. 2 에서 보여준 세번째 peak은 단일 peak이 아니라 2 개로 갈라진 형태로 나타나는데 이것으로 보아 두 물질 이상의 혼합물이라고 추정할 수 있다. Buthanol층 분획 추출물에서부터 silica gel 컬럼 크로마토그래피, preparative TLC 그리고 HPLC 단계까지의 수득물과 elastase를 저해시키는 IC₅₀ 값은 Table 2 에 있다. 빈랑의 90% 에탄올 추출물로부터 HPLC 단계까지 정제된 저해 물질은 PPE에 대한 IC₅₀ 값은 26.9 µg/ml, 그리고 HNE에 대한 IC₅₀ 값이 60.8 µg/ml로 뛰어난 저해 효과를 보여주었다.

2. 저해 물질의 분석

빈랑으로부터 HPLC 단계까지 정제한 시료가 어떤 종류의 화합물인지 알아보기 위한 UV, IR 스펙트럼을 얻었다. 또한, 색 변화로써 알 수 있는 여러 가지 정색 반응을 실시하였다.

UV 스펙트럼 결과, 280 nm에서 최대 흡광을 나타내었고 이것으로 aromatic ring을 가진 화합물임을 추정할 수 있었다. 또한 가시광선 파장에서도 약간의 흡수를 나타냈는데 이것은 저해 물질의 색이 갈색을 띠고 있는 것을 설명해 줄 수 있다 (Data not shown). IR 스펙트럼에서는 3367.10 (OH), 1617.02 (C=C conjugated), 1110.31 (C-O) cm⁻¹을 추정할 수 있었다 (Fig. 2). 이 스펙트럼은 Keijiro Uchino 등이 빈랑으로부터 분리한 polyphenolic 화합물들의 IR 스펙트럼과 거의 일치하고 있다 (16).

유효 성분의 구조 연구시 검색의 단서가 될 수 있는 방법으로 정색 반응이 있다 (17). 빈랑으로부터 HPLC 단계까지 정제한 저해 물질의 UV 스펙트럼 결과로부터, 280 nm에서의 흡광이 tyrosine, tryptophan, phenylalanine과 같은 방향족 아미노산에 의한 것인지를 확인해 볼 필요가 있었다. 그래서 HPLC 단계까지 정제한 저해 물질로 닌히드린 반응을 실시했다. 닌히드린 반응에서는 아미노산이 존재할 경우 자색으로 정색되는데, 시험 결과 색변화 없이 음성 반응임을 관찰하였다. 이 결과로부터 분리된 저해 물질은 아미노산이나 단백질이 아님을 확인할 수 있었다. Flavonoids, tannins을 포함한 phenol 성 물질은 2.5% FeCl₃ 용액을 가하면 짙은 녹색, 자주색, 청색, 또는 흑색으로 정색되는데, HPLC까지 정제된 저해 물질은 암녹색으로 변화하고 농도가 높을 경우에는 암녹색의 침전물을 형성했다. 이것으로 저해제가 phenol 성 물질임을 확인할 수 있었다. 그 다음으로

triterpenoids나 saponins인 경우는 무수 초산을 첨가한 다음 황산을 가하면 적갈색을 나타내는데, 이 실험 결과에서는 색 변화가 없어 분리된 저해 물질이 triterpenoids나 saponins은 아님을 확인할 수 있었다. 또 시료내에 당의 여부를 확인하는 Molish 반응이 있다. 이것은 5% α -naphthol 에탄올 용액 2-3 방울을 넣은 후 황산을 가하면 적자색환이 나타난다. 분리된 저해제를 시험한 결과 적자색환을 관찰할 수 있었으며, 이로써 시료내에 당도 존재함을 알 수 있었다. 위의 결과로 종합해 볼 때, 빈랑으로부터 분리된 elastase 저해 물질은 당이 함께 존재하는 phenol 성 물질임을 추측할 수 있었다.

하나 또는 둘 이상의 OH기로 치환된 방향족환을 가지고 있는 식물 성분을 일반적으로 phenol 성 물질이라고 하는데, phenol 성 물질은 당과 결합하여 배당체로서 존재하는 경우가 많으므로 보통 수용성이다. Phenol 성 물질 중에는 항균작용이 있는 물질이 많으므로 진균, 세균 또는 virus등 병원체의 침입에 대한 방어작용을 할 것이라고 보고 되고 있다 (18). 또한 항암 작용, 혈압강하 작용, 피임 작용, 간보호 작용, 진경 작용등 여러 작용이 알려져 있으며, 의약품 개발에 밝은 전망을 보여주고 있다 (17).본 연구에서 빈랑으로부터 정제한 phenol 성 물질로 추정되는 성분은 elastase를 저해함으로써 피부 결합 조직 단백질들을 보호하여 피부 노화 방지제 개발에 도움을 줄 수 있을 거라 생각된다.

3. Elastase와 저해 물질과의 상호작용

빈랑으로부터 HPLC 단계까지 분리한 활성 성분으로 돼지 췌장 elastase (PPE)와 사람 백혈구 elastase (HNE)에 대하여 저해 효과를 조사하였다. 분리된 활성 성분은 농도가 높을수록 PPE에 대한 저해 활성이 증가하는 형태를 보였으며, IC_{50} 값은 $26.9 \mu\text{g/ml}$ 로 매우 낮게 나타났다. 이것은 elastase의 저해제로 알려져 이미 상품화까지 되어 있는 oleanolic acid ($IC_{50} : 76.5 \mu\text{g/ml}$)와 ursolic acid ($IC_{50} : 31 \mu\text{g/ml}$)보다 우수한 저해 활성을 가지고 있었다 (19) (Fig. 3). 마찬가지로 저해 물질의 농도가 높을수록 HNE에 대한 저해 활성도 증가하는 형태를 보였으며, IC_{50} 값은 $60.8 \mu\text{g/ml}$ 로 PPE에 대한 값보다는 높지만 좋은 저해 활성을 나타냈다. 이 또한 oleanolic acid ($IC_{50} : 219.2 \mu\text{g/ml}$)와 ursolic acid ($IC_{50} : 118.6 \mu\text{g/ml}$)보다 우수한 저해 활성을 보여 주었다 (Fig. 4). Oleanolic acid와 ursolic acid는 isoprene 분자 ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) 6 개가 이루어져 비교적 복잡한 환상구조를 가지는 triterpenoid 화합물이다 (17). 빈랑으로부터 분리된 활성 성분은 elastase 저해제로 알려진 이들 triterpenoid 화합물보다 더 좋은 저해 활성을 나타내 주고 있다.

빈랑으로부터 분리한 활성 성분의 elastase에 대한 저해 유형을 알아보기 위해 합성

펩타이드 기질 농도를 0 - 10 mM까지 다양하게 변화시킨 assay 용액에 농도를 달리한 저해 물질을 첨가하여 그 반응 양상을 조사하였다. PPE의 경우, 저해 물질의 농도를 각각 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 변화시켰고, HNE의 경우는 각각 0, 20, 60, 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 저해제를 첨가한 다음 일정한 농도의 효소를 넣어줌으로써 반응을 시작했다. Lineweaver-Burk plot을 해본 결과 저해 물질은 PPE와 HNE 모두에 대하여 기질과 경쟁적으로 반응함을 확인하였다 (Fig. 5, 6). 이것은 elastase의 기질 결합 자리에 대한 저해제의 특이적 상호작용을 나타내 주는 결과이다.

4. 저해 물질의 free radical 소거 작용

빈랑으로부터 정제한 물질이 free radical을 소거할 수 있는 능력이 있는지 알아보려고 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)를 사용하여 확인하였다. DPPH는 화합물내 질소 중심의 radical로 radical 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 radical로 존재한다. DPPH는 517 nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517 nm에서 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH의 환원정도는 환원제의 환원력에 달려 있다. 시료의 환원력의 크기는 radical 소거 활성 (scavenging activity, SC_{50})으로 표시하며, SC_{50} 은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 나타낸다.

빈랑으로부터 정제한 시료는 SC_{50} 값이 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서, 표준 항산화 물질로서 알려진 비타민 C (19 $\mu\text{g}/\text{ml}$)나 butylated hydroxyl toluene (18.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 우수한 free radical 소거 능력을 가지고 있었다 (Fig. 7). Free radical들은 피부 노화 뿐만 아니라 염증이 유발되는 과정에도 참여하므로 환원력이 큰 항산화제들을 이용하여 산화적 손상을 차단시켜야 한다. 자연에 존재하는 항산화 물질로는 토코페롤이나 플라보노이드 (flavonoid)들을 포함하여 많은 polyphenolic 물질들이 보고되고 있고, 이들은 특히, 식물 추출물에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 빈랑에서 정제한 시료도 정확한 구조는 알 수 없지만 phenol 성 물질로 추정되므로 위 실험 결과를 설명해 줄 수 있다고 판단된다.

5. 분리된 물질의 Hyaluronidase 저해 활성

빈랑으로부터 정제한 elastase 저해 물질이 hyaluronic acid를 분해하는 hyaluronidase를 저해할 수 있는지 알아보려고 다양한 농도에서 효소 저해 효과를 측정하였다. 그 결과, 시료량이 증가할수록 저해 활성이 증가함을 관찰할 수 있었고, 시료의 IC_{50} 값은 210 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었다. 이미 hyaluronidase 저해 효과가 좋다고 알려진 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*) 추출물을 비교 물질로 사용하였는데, 이 추출물의 IC_{50} 값은

330 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이것으로 빈랑으로부터 HPLC 단계까지 정제된 활성 성분은 감초 추출물보다는 우수한 hyaluronidase 저해 활성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 이 결과로부터, 빈랑으로부터 정제한 elastase를 저해시키는 활성 성분은 hyaluronidase도 효과적으로 저해시킴을 알 수 있었다. 이처럼 두 효소를 모두 저해시키는 물질로 hederagenin, oleanolic acid 등이 보고된 바 있다 (19). 또한, flavonoids나 tannins과 같은 phenol성 물질은 hyaluronidase 활성을 저해시키는 강력한 저해제로 알려져 있다 (20, 21). 빈랑으로부터 분리한 성분도 phenol 성 물질로 추측되므로 이 실험 결과를 설명할 수 있을 것이다. 피부의 탄력은 결합 조직 성분들인 collagen, elastin과 함께 hyaluronic acid의 점탄성이 크게 기여하고 있다. 따라서, 빈랑으로부터 정제한 활성 성분의 elastase와 hyaluronidase에 대한 저해 효과는 피부 노화 방지 및 염증 억제 효과에 기여할 수 있으리라 생각된다.

IV. 참고 문헌

1. Aaron Janoff, *Ann. Rev. Med.* **36**, 207-216 (1985)
2. Burchardi, H., Stokke, T., Hensel, I., Koestering, H., Rahlf, G., Schlag, G., Heine, H., and Horl, W.H., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **167**, 319 (1984)
3. Janoff, A., in *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes*, Havemann, K., and Janoff, A., Eds., Urban and Schwartzberg, Ins., Baltimore, MD, 390, (1978),
4. Powers, J.C., and Bengali, Z.H., *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**, 1079-1100 (1986)
5. Glinski, W., Zarebska, Z., Jablonska, S., Imiela, J., and Nosarzewski, J., *J. Invest. Dermatol.* **75**, 481-487 (1980)
6. Briggaman, R.A., Schechter, N.M., Fraki, J., and Lazarus, G.S., *J. Exp. Med.* **160**, 1027-1042 (1984)
7. Rice, W.G. and Weiss, S.J., *Science*, **249**, 178 (1990)
8. Rosenberg, S., Barr, P.J., Najarian, R.C., and Hallewell, R.A., *Nature*, **312**, 77 (1984)
9. Philip D. Edwards and Peter R. Bernstein, *Medicinal Research Reviews*, **14**, 127-194 (1994)
10. Lee, K. K., Cho, J. J., and Choi, J. D., *Int. J. Cosmet. Sci.*, **21(2)**, 71-82(1999)
11. Lee, K. K. and Choi, J. D., *Int. J. Cosmet. Sci.*, **21(4)**, 285-295(1999)
12. James A.E. Kraunsoe, Timothy D.W. Claridge, and Gordon Lowe, *Biochemistry* **35**, 9090-9096 (1996)
13. Erlanger, B.F., Kokowsky, N. and Cohen, W., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271-278 (1961)
14. Fugita Y., Uehara I., Morimoto Y. and Okuda T., *Yakugak Zasshi*, **108**, 129-135 (1988)
15. Kim, Y.S., Noh, Y.K., Lee, G.I., Kim, Y.K., Lee, K.S., and Min, K.R., *Kor. J.*

Pharmacogn. **26**, 265-272 (1995)

16. Keijiro Uchino, Toshiharu Matsuo, Masaya Iwamoto, Yasuhiro Tonosaki, and Akira Fukuchi, *Planta medica*, October **26**, 419-422 (1987)
17. 우원식, 천연물화학 연구법, 서울 대학교 출판부
18. Friend, J., *Biochemistry of plant phenolics*, Plenum, N.Y., 557-588 (1977)
19. M. Carini, R. Maffei Facino, A. Brambilla, R. Stefani, C. Scesa, IFSCC, 826-835, Venezia (Poster)
20. Lee, J., Lee, S.H., Min, K.R., Lee, K.S., Ro, J.S., Ryu, J.C., and Kim, Y., *Planta Med.* **59**, 381-382 (1993)
21. Kuppusamy, U., and Das, N.P., *Experientia* **47**, 1196-1200 (1991)

Table 1. Yields and elastase inhibitory activities of solvent fractions of 90% ethanol extract obtained from *Areca catechu*.

solvent fractions	yield (%)	IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
90 % Ethanol	100	64.05
Hexane	3.39	>500
Chloroform	1.05	>500
Ethylacetate	5.97	>500
Buthanol	21.90	104.93
Water	30.29	31.04

The IC₅₀ values were calculated from a nonlinear regression plot of elastase inhibition

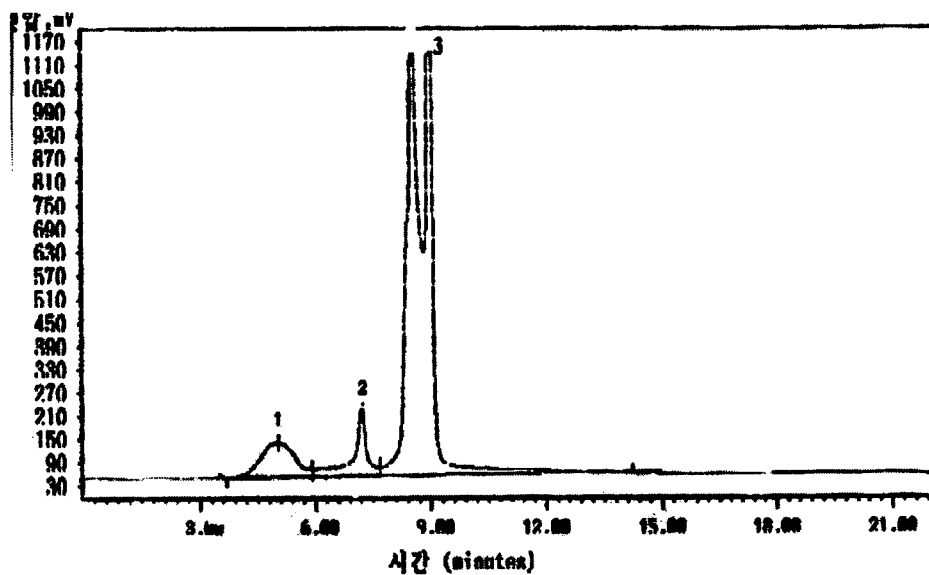


Fig. 1. HPLC chromatogram of the active sample from preparative TLC. Column : YMC-PACK ODS-AQ (10mm×250mm), Mobile phase : MeOH/H₂O (30:70), flow rate : 1.5 ml/min, column temp. : 40 °C, detection : UV 280 nm

Table 2. Yields and elastase inhibitory activities of purification steps from *Areca catechu*.

purification step	yield (%)	IC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
BuOH layer extract	100	104.9
Silica column chromatography	28.2	31.6
preparative TLC	3.9	25.0
HPLC	2.8	26.9

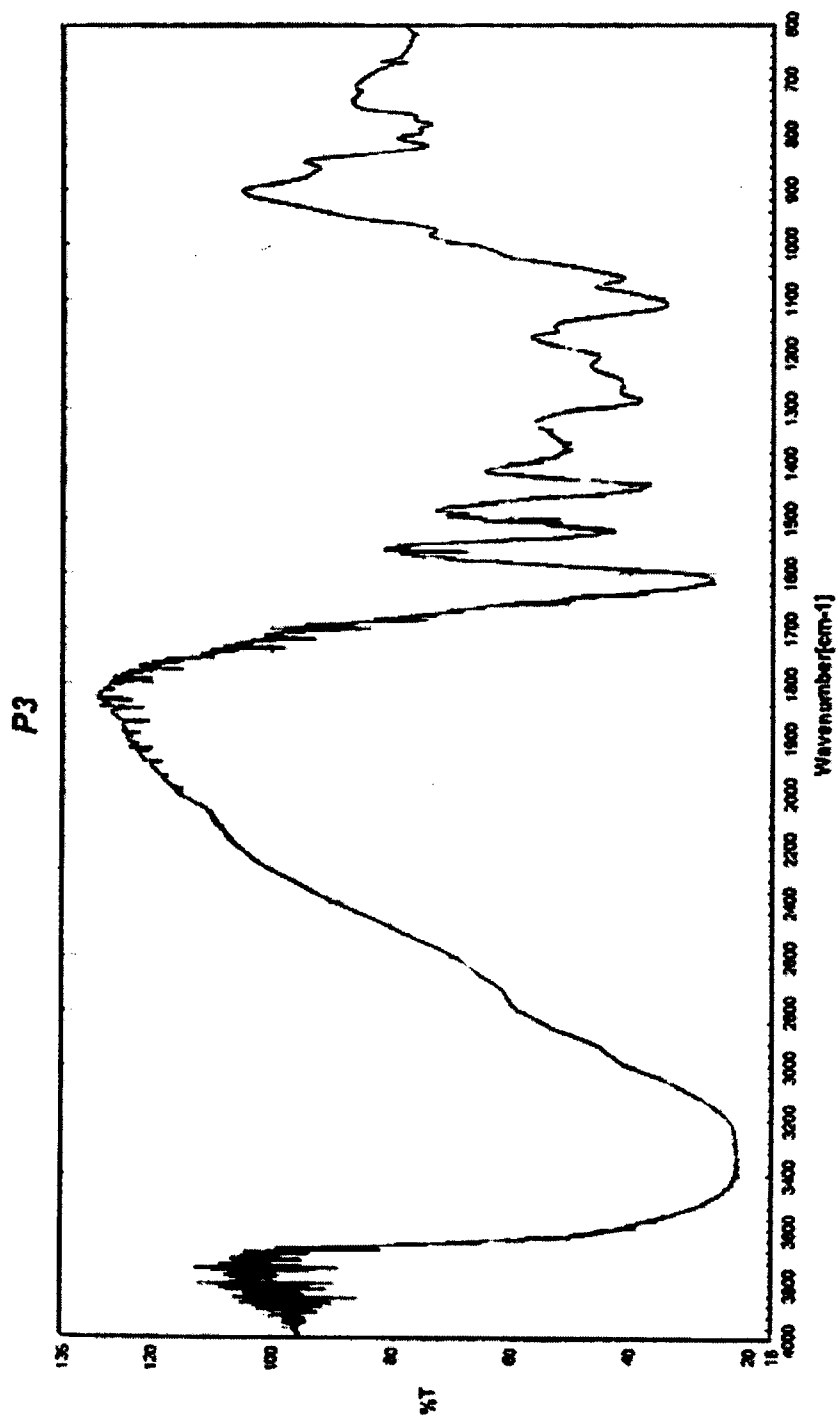


Fig. 2. IR absorption spectrum of the active peak from HPLC

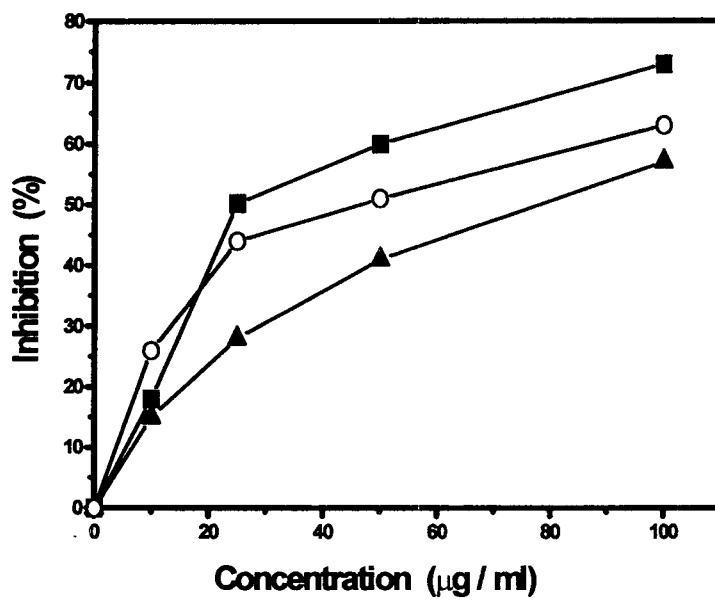


Fig. 3. Inhibition of porcine pancreatic elastase by the active peak from HPLC (■), oleanolic acid (▲) and ursolic acid (○).

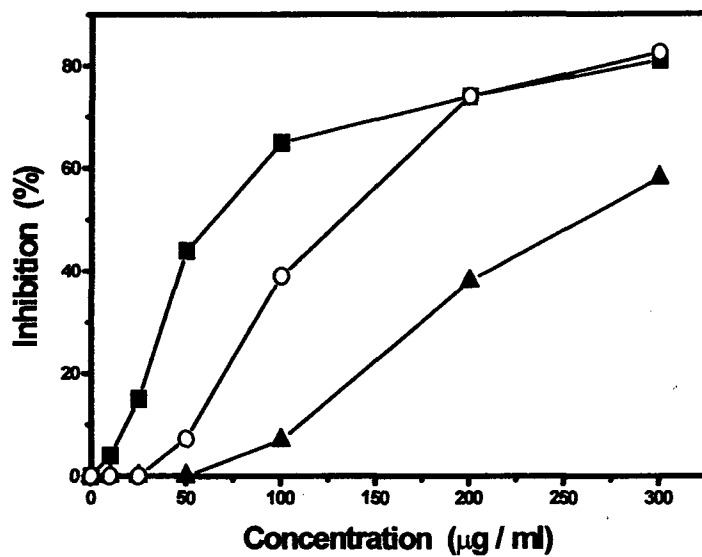


Fig. 4. Inhibition of human neutrophil elastase by the active peak from HPLC (■), oleanolic acid (▲) and ursolic acid (○).

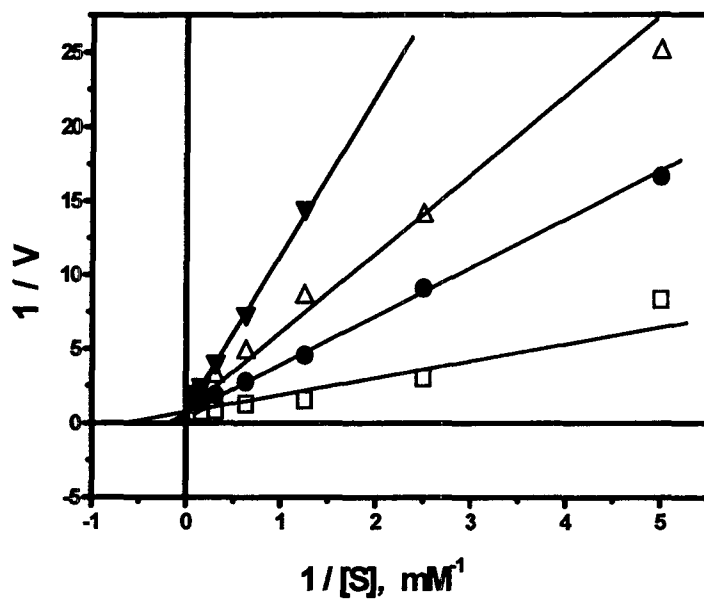


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of inhibition of porcine pancreatic elastase by the active peak from HPLC. The concentration of active peak from HPLC were 0 (\square), 10 (\bullet), 50 (\triangle), 100 (\blacktriangledown) $\mu\text{g/ml}$.

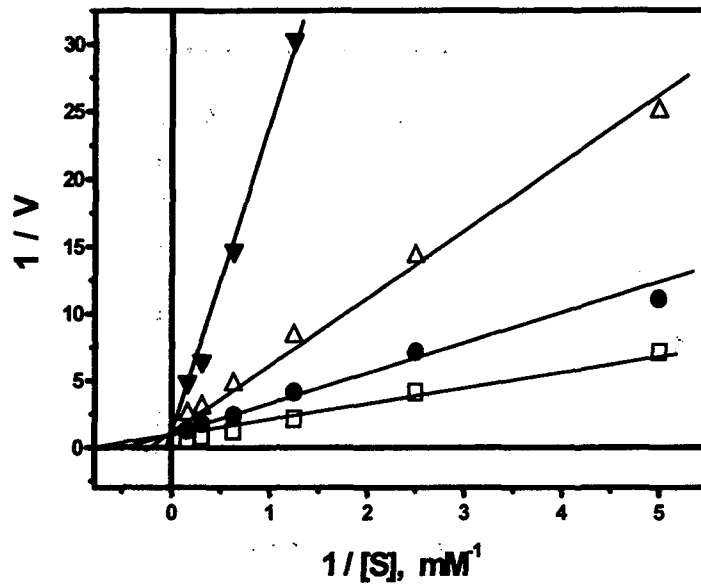


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of inhibition of human neutrophil elastase by the active peak from HPLC. The concentration of active peak from HPLC were 0 (\square), 20 (\bullet), 60 (\triangle), 120(\blacktriangledown) $\mu\text{g/ml}$.

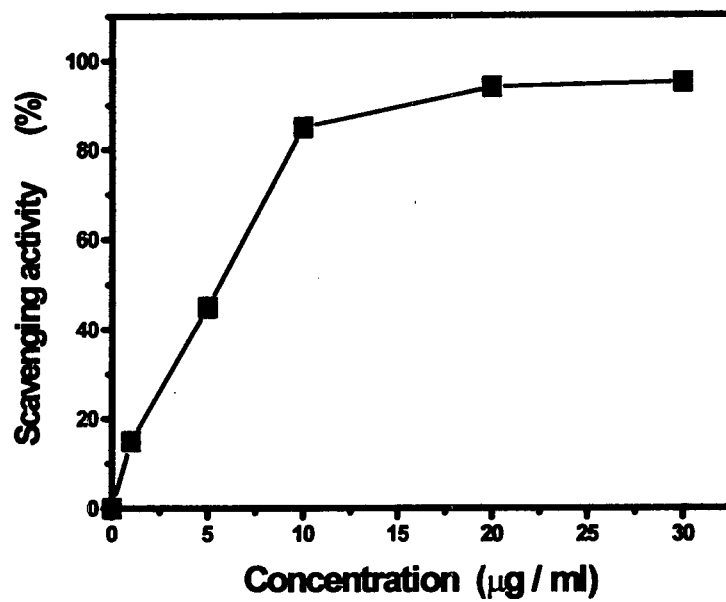


Fig. 7. Free radical scavenging effect of the active peak from HPLC

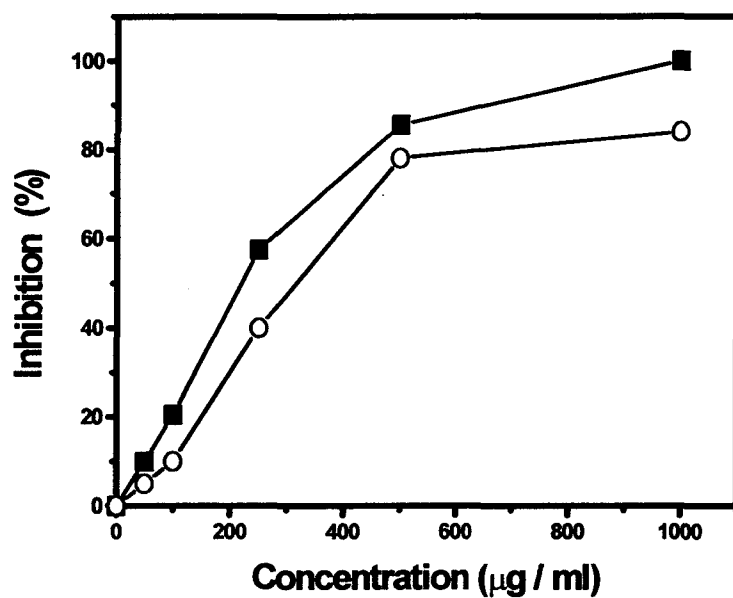


Fig. 8. Inhibition of hyaluronidase by the active peak from HPLC (■) and *Glycyrrhiza uralensis* (○).